



проект BG05M2OP001-1.002-0001-C04
„Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“

ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ГОДИШНАТА ПРОГРАМА ЗА 2021 г.

А. Анализ на капацитета на научно-изследователската структура.

През 2021 г., поради забавяне на строително-ремонтните дейности, планираните нови лаборатории все още не работят като самостоятелни инфраструктурни единици. Апаратурата, закупена със средства по проекта, беше инсталирана в съществуващите лабораторни звена. Научно-изследователските задачи се изпълняваха с помощта на новата апаратура и с реактиви и консумативи, осигурени със средства по проекта и от други източници.

В допълнение на апаратурата, инсталирана и въведена в употреба от Пратнър 1 до края на 2020 г.,

- Компактен флуориметър за прецизно измерване на нуклеинови киселини и протеини; (*Лаборатория за работа с вируси с III-то ниво на биологична защита*)
- Автоматизирана система за отчитане и интерпретация на антибиограми (*Експертна лаборатория за молекулярногенетичен, спектрометричен и протеомен анализ*)
- Мултифункционален ридер за микроплаки (*Експертна лаборатория за комплексни имунологични анализи*)
- Мултирежимен ELISA четец, 10 бр.
- Фрагментен анализатор за качествен и количествен контрол на нуклеинови киселини с множество приложения (*Лаборатория за работа с вируси с III-то ниво на биологична защита*);
- Секвенатор от ново поколение за de-novo секвениране на малки геноми и таргетно секвениране с цел диагностика (*Лаборатория за работа с вируси с III-то ниво на биологична защита*);
- Апарат за мултиплексен анализ върху микросфери (*Експертна лаборатория за комплексни имунологични анализи*);
- Система за бърза идентификация на особено опасни бактерии от рисковата група 3, базирана на мас-спектрометрия и протеомен анализ;
- Система за бърза идентификация на микроорганизми от рисковата група 2 и доказване на механизми на антибиотична резистентност, базирана на мас-спектрометрия и протеомен анализ;

- Високо-продуктивна автоматизирана система за секвениране и фрагментен анализ на нуклеинови киселини;
- Клетъчен сортер на базата на 4 лазерна мултипараметърна флоуцитрометрия (FACS) (*Експертна лаборатория за комплексни имунологични анализи*);
- Автоматичен клетъчен брояч (*Експертна лаборатория за комплексни имунологични анализи*);
- Фотодокументационна система за агарозни гелове с трансилюминатор – 5 бр.
- Капкова дигитална PCR система за абсолютно количествено определяне на таргетни ДНК или РНК молекули;
- Апарат за провеждане на Полимеразно-верижни реакции в реално време (Real-time PCR) - 12 бр.;
- Конвенционален градиентен PCR апарат - 10 бр.;
- Помощно оборудване: Инкубатор за PCR плаки с прецизно поддържане на температура; Високооборотна орбитална клатачка; Магнитна плака за разделяне на парамагнитни частици

през 2021 г. са договорени, след проведена процедура по ЗОП, закупени и частично въведени в употреба, както следва :

- Високопроизводителен настолен апарат за новогенерационно секвениране с капацитет за цялостно de-novo секвениране на всички видове геноми, екзоми, транскриптоми и цялостен метагеномен анализ
 - Автоматизирана система от отворен тип за пречистване на нуклеинови киселини
 - Конфокален лазерен сканиращ микроскоп
 - Трансмисионен електронен микроскоп с ултрамикротом
 - Флуоресцентен микроскоп със специализиран софтуер за in situ хибридизация
 - Ултразвукови дезинтегратори за индиректна обработка на проби с малки обеми в затворени съдове
 - Аналитични везни
 - Дюарови съдове за съхранение на биологични проби в течен азот
 - Високооборотна, подова, хладилна центрофуга за центрофугиране на големи обеми и комплект ротори и адаптори (*Експертна лаборатория за молекулярно генетичен, спектрометричен и протеомен анализ*);
 - Спектрофотометър за плаки
 - CO2 инкубатори
 - Компютърни конфигурации с шестядрен процесор за офис работа
 - Компютърна конфигурации - работни станции
 - Проектори Acer P5630
 - Копирни машини Xerox AltaLink C8170
 - Файлов сървър FUJITSU PRIMERGW RX2540 M5
- След проведена процедура по ЗОП през 2021 г. са доставени лабораторни консумативи по работни пакети 2, 3 и 4 на проекта .

От Партньор ИмБ - БАН : Микроскопска апаратура, Система за хистологични

Изследвания, Микроарей скенер, съдова система за течен азот, дълбоко замразяващ фризер, автоматизиран брояч на клетки, система за йонизирана вода, многорежимен четец, спектрофотометър везни, хладилна центрофуга

Пратнър 2 НДНИВМИ: През 2021 г. е приключило закупуването на предвидената апаратура, в началото на 2022 г. тече процедура по ЗОП за доставка на необходимите лабораторни консумативи.

През 2021 г. в Центъра не са се извършвали дейности със стопански характер, като новозакупеното и инсталирано оборудване е използвано изключително за научно изследователски и образователни дейности (вж. Приложение 1). Считано от 1.07.2021 г. са назначени 4-ма водещи изследователи от научния екип. Освен тях, в рамките на работното си време, задачи, свързани с научната тематика на проекта, в т.ч. работа с новоинсталираната апаратура, са изпълнявали още 15 изследователи (вж. Приложение 2).

Б. Изпълнение на дейностите

Дейност 1. Модернизирание на научноизследователската инфраструктура в центъра за компетентност.

1. След многократни преработки и отстраняване на пропуски, почти изцяло е завършен инвестиционният проект за СМР в сградата на бул. Столетов 44А за изграждане на
 - Лаборатория с III ниво на биологична защита по особено опасни бактериални инфекции
 - Лаборатория с III ниво на биологична защита за вируси
 - Експериментална лаборатория по молекулярно-генетичен анализ с целогеномно секвениране на вируси
 - Биологична банка (Заб. ВД - в други документи наречено "Биологично банкиране")
 - Експериментална лаборатория по морфологичен анализ
2. Поради значителното забавяне на втория инвестиционен проект, в края на 2021 г. ЕУП взе решение за разделно обявяване на процедурите по ЗОП за изпълнител на СМР и бе стартирана подготовка на техническата спецификация за сградата на адрес бул. Я. Сакъзов 2б, вкл.
 - Експертна лаборатория за молекулярно-генетичен, спектрометричен и протеомен анализ
 - Експертна лаборатория за комплексни имунологични анализи
 - Учебен център с лекционна зала
3. Доставено и инсталирано оборудване по сключени договори

В НЦЗПБ на практика е закупена и доставена над 95% от планираната апаратура. Не е въведено в употреба оборудването, пряко зависимо от СМР: електронният микроскоп, част от компютърната и копиран техника, предназначена за учебния център. Оставащите средства за помощно оборудване и мебелировка на лабораториите зависят от СМР. По възможност част от останалите средства ще бъдат пренасочени за осъществяване на СМР.

Дейност 2. Идентификация на микроорганизми и анализи на циркулиращите в страната патогени

Научно-изследователските дейности се извършват съгласно планираната тематика, както следва

1. Характеризиране на потенциално нов бактериален патоген от род *Corynebacterium* чрез целогеномен секвентен анализ Ръководител: доц. Иван Иванов, зав. НРЛ-КМАР, НЦЗПБ Участници: колектив от НРЛ-КМАР, НЦЗП, НДНИВМИ, ИМ-БАН

След извършване на предварителните биохимични, морфологични и молекулярно-генетични анализи за характеризирание на щама, съвместно с екип от НДНИВМИ извършихме изпитвания чрез разширен биохимичен и антиминобен панел посредством системата BIOLOG (плака GEN III). Резултатите показаха наличие на висока метаболитна активност необичайна за р. *Corynebacterium*.

Извършен бе сравнителен геномен анализ за откриване на най-близките таксономични единици с използване на онлайн базата данни EzBioCloud. Според официалните критерии, се касае за нов вид *Corynebacterium spp. nov* (16S rRNA <98.7% **или** ANI <95%), с най-близко родствен вид *Corynebacterium pollutisoli* (16S rRNA= 96.04%, ANI = 83.69%). Идентифицирани бяха и гени кодиращи шест потенциални вирулентни фактора: *phoP*, *relA*, *katA*, *iroB*, *ideR* и *pchD*

Предстои провеждане на дълговерижно геномно секвениране с цел получаване на пълния геном.

2. Характеризиране на потенциално нов бактериален патоген от род *Proteus* чрез целогеномен секвентен анализ; Ръководител: доц. Иван Иванов, зав. НРЛ-КМАР, НЦЗПБ Участници : колектив от НРЛ-КМАР, УСАБАЛО

След извършване на предварителните биохимични, морфологични и молекулярно-генетични анализи за характеризирание на щама, съвместно с екип от НДНИВМИ извършихме изпитвания чрез разширен биохимичен и антиминобен панел посредством системата BIOLOG (плака GEN III). Резултатите показаха типичен метаболитен профил за р. *Proteus* с най-близки представители *P. penneri*, *P. vulgaris*, *P. hauseri* и *P. mirabilis*.

Извършен бе сравнителен геномен анализ за откриване на най-близките таксономични единици с използване на онлайн базата данни EzBioCloud. Според официалните критерии, се касае за нов вид *Proteus spp. nov* (16S rRNA <98.7%, **или** ANI <95%), с най-близко родствен геномен вид *Proteus UGTU_s* (16S rRNA=97%, ANI = 83.69%).

Предстои провеждане на дълговерижно геномно секвениране с цел получаване на пълния геном.

3. Молекулярно-генетично проучване на механизмите на антиминобна лекарствена резистентност на клинично значими изолати *Clostridioides difficile* Ръководител: гл.ас. Елина Добрева, дб Научен колектив: сътрудници от НРЛ-КМАР (НЦЗПБ) и МИ-МВР-София (Микробиология)

Към момента е извършено следното:

- Продължаване събиране на клинични материали (фецес) от амбулаторни и хоспитализирани пациенти (с приоритет пациенти с Covid-19) със симптоматика, характерна за *Clostridioides*

difficile инфекция (CDI).

- Получаване на 16 изолата *C. difficile* чрез анаеробно култивиране.
- Идентификация на получените 16 изолата чрез MALDI-TOF автоматична система
- Проучване на чувствителността на изолатите към метринидазол и ванкомицин, посредством метод за определяне на минимална инхибираща концентрация (Е-тест). Всички изследвани изолати показват чувствителност към изследваните антимикробни средства.

4. Цялостно геномно секвениране на производствени, ваксинални и други щамове на *M. Tuberculosis* с цел охарактеризиране и създаване на "паспорт" на щам. Ръководител: проф. Стефан Панайотов, НЦЗПБ Участници: НРЛ „ООИ“- сектор „Микробиом“, НЦЗПБ; лаборатория БЦЖ на БулБио-НЦЗПБ

завършен

Секвениран е производствения ваксинален щам БЦЖ SL222 София с помощта на две техники – секвениране на къси фрагменти с помощта на технологията Illumina и секвениране на дълги фрагменти с помощта на технологията Nanopore.

Получени резултати: Пълният геном на производствения ваксинален щам БЦЖ SL222 София е секвениран, сглобен, аотиран и е проведен филогенетичен сравнителен анализ с известните други секвенирани БЦЖ производствени щамове. Резултатите са публикувани

5. Идентификация и генетична характеристика на циркулиращите щамове HIV-1 в България чрез генотипиране и секвениране на вирусния геном с новогенерационно секвениране. Ръководител: доц. Ивайло Иванов, НРЛ по HIV, НЦЗПБ Участници: екип на НРПЛ по ХИВ, НЦЗПБ

Изпълнена е част от първи етап от проекта:

събиране на клинични проби от лица с установена HIV инфекция. Подбраните 24 проби са от лица от различни географски райони, различни възрасти и пол и различни трансмисионни групи, диагностицирани с HIV по различно време. Събраните кръвни плазми се съхраняват във фризер на -80°C

заявени са консумативите по Договор №283/12.11.2020 г., по ОП „Доставка на лабораторни консумативи по работни пакети 1, 2 и 3 по проект BG 05 M2 OP 001-1.002-0001, ОП „НОИР“ процедура BG 05 M2 OP 001-1.002 “Изграждане и развитие на центрове за компетентност“ и се очаква тяхната доставка, за да се пристъпи към следващите етапи от изпълнението на мини проекта.

Извършена е експериментална работа за апробиране на нов метод за новогенерационно секвениране на HIV с Illumina MiSeq. Предстои да бъдат секвенирани клинични проби и да бъде извършен анализ на резултатите.

Срок за изпълнение

Изпълнението на проекта ще бъде извършено до декември 2023 г.

Проучване на пневмококовото носителство при деца до 5 годишна възраст и анализ на разпространените серотипове, свързани с въведените пневмококови ваксини през последните години. Ръководител: доц. Виктория Левтерова Участници: гл.ас. И. Симеоновски, гл.ас.Н.Бранкова, гл.ас. И. Филипова - НЦЗПБ

До момента са събрани 17 ликвора за 2020 г. и 8 за 2021г. от пациенти болни от менингит от всички възрастови групи. Изолирана е ДНК от тях. Пуснати са на PCR и се доказва наличието на *S. pneumoniae* в 3 материала . Въз основа на анализа се подбират положителните за *S. pneumoniae* и се съхраняват на -20 0 С. Изчаква се получаване на реактивите за типизиране с алел специфична хибридизация, чрез която ще се типизират.

7. Молекулярен мониторинг на генотиповете на *N. meningitidis* като причинители на бактериални менингити в България Ръководител: гл.ас.Иван Симеоновски

Участници: доц. Виктория Левтерова, гл.ас.Надя Бранкова, гл.ас. Ива Филипова- НЦЗПБ

До момента са събрани 17 ликвора за 2020г. и 8 за 2021г. от пациенти болни от менингит от всички възрастови групи. Изолирана е ДНК от тях. Пуснати са на PCR и се доказва наличието на *N. meningitidis* при 2бр.за 2020г. и 1 брой за 2021г.. Въз основа на анализа се подбират положителните за *N. meningitidis* и се съхраняват на -20 0 С. Изчаква се получаване на праймери и сонди за типизиране на изолираните *N. meningitidis*.

Генетични методи за идентификация и епидемиологично маркиране на причинителя на коклюш в България Ръководител: Гл. ас. Надя Бранкова, дм Участници: екип на НРЛ „Молекулярна микробиология и НРЛ КМАР НЦЗПБ

Събират се материали от пациенти от всички възрастови групи, суспектни за коклюш. До момента са събрани 31 клинични материала. Извършва се изолиране на ДНК и се доказва наличието на *B.pertussis* в клиничните материали. Въз основа на анализа се селектират подходящите проби за последващо типизиране.

Поръчани са праймери и други необходими консумативи за генотипизирането

9.Анализиране на генотипното разнообразие на циркулиращите в страната *HBV* и *HCV* при наивни, моно- и ко-инфектирани пациенти. Геномна характеристика на циркулиращите в страната щамове *HEV* в човешка и животинска популация; природни резервоари и трансмисионни пътища. Ръководител: Д-р Тенчо Тенев, НРЛ хепатитни вируси, НЦЗПБ Участници: екип на НРЛ хепатитни вируси, НЦЗПБ

Извършен е подбор на клинични проби от пациенти с диагноза остър и хроничен вирусен хепатит. Чрез ELISA са доказани специфични серологични маркери за наличие на хепатит В, С и Е вирусна инфекция, както следва:HBsAg : 103 положителни проби /707 изследвания; anti

За хепатит тип С (anti HCV) са извършени 574 изследвания с потвърдени 79 положителни проби. За остра хепатит Е вирусна инфекция (HEV-IgM) са изследвани 470 проби, като положителните са 46. За HEV-IgG са изследвани 413 проби с 56 положителни резултати.

На положителните проби е извършена екстракция за изолиране на вирусна нуклеинова киселина (HEV RNA, HCV RNA и HBV DNA) с последващо определяне с RT-PCR на количеството на вирусния товар: За HBV DNA - 69 положителни от 126 изследвани серума, За HCV RNA - 57/

За HEV RNA : 11/ 76 . Пробите с вирусен товар се съхраняват във фризер на -80°C за последващо генотипиране и секвениране след получаване на необходимите диагностикуми.

Идентификация, типирание и субтипирание на циркулиращите в страната респираторни вируси Ръководител: проф. д-р Нели Корсун, дмн, НРЛ „Грип и ОРЗ”, НЦЗПБ Участници: екип на НРЛ „Грип и ОРЗ”, НЦЗПБ

През 2021 г. са изследвани за грипни вируси чрез Real-Time RT-PCR 2194 клинични проби. Доказан е един грипен вирус А(Н3N2) през декември 2021 г. За SARS-CoV-2 са изследвани с Real-чрез Real-Time RT-PCR за осем често срещани негрипни респираторни вируси: респираторно-синцитиален вирус, метапневмовирус, парагрипни вируси, рино-, адено- и бокавируси. Установени са случаи на ко-инфекции между SARS-CoV-2 и друг респираторен вирус.

II. Въвеждане на целогеномно секвениране за молекулярно типизиране и характеризиране на циркулиращите в България M/XDR-TB щамове Ръководител: доц. д-р Елизабета Бачийска, Участници: екип от НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ

Изолиране на ДНК от всички потвърдени щамове *M. tuberculosis* с моно-, поли-, мулти-, пре-екстензивна и екстензивна резистентност, циркулиращи на територията на страната през 2020г., които са охарактеризирани фенотипно (чрез ВАСТЕС MGIT и Льовенщайн-Йенсен) и молекулярно-генетично (чрез LPA). Извършено целогеномно секвениране на 24 резистентни щама *M. tuberculosis*. Получените резултати са обработени. Предстои публикация.

Идентификация, анализ на паразити и молекулярна епидемиология на паразитозите

Ръководител: Доц. Нина Цветкова, дб Участници: А. Иванова, д-р Р. Борисова, М. Виденова, Е. Кънева, д-р Искрен Кафтанджиев (ОПТМ-НЦЗПБ), доц. Л. Гломб, гл. ас. М. Павлова, НЦЗПБ; доц. Николай Лалковски (НДНИВМИ)

Набиране /съхранение на проби: 316 (бронхо-алвеоларен лаваж, индуцирана хрчка, трахеален аспират и гърлен секрет за пневмоцисти – 70, хепаринизирана кръв за маларийни плазмодии – 26, урина/еякулат за трихомони – 4, материали от костен мозък, кожа и кръв с EDTA за лайшмани – 4, материали от ликвор за токсоплазми – 2, фецеси за бластоцисти, гиардии и криптоспоридии – 207, трихинелни ларви, изолирани от суджук от домашно прасе за видова идентификация -3).

Извършени изследвания: 70 PCR анализа в реално време; 5 конвенционални PCR анализа и 3 мултиплекс гнездови PCR анализа.

Получени резултати: Положителен сигнал от PCR анализа в реално време получихме в 11 от анализиранияте клинични материали за *P. jirovecii*. От изследваните с конвенционален PCR материали се позитивираха 1 за наличие на ДНК на *Leishmania* spp., 1 за ДНК на *Toxoplasma gondii*. Трихинелните ларви бяха идентифицирани като принадлежащи към вида *T. britovi*. От изследваните фецеси, 18 бяха положителни за *Blastocystis* spp, 2 за *Giardia duodenalis*, 1 за *Cryptosporidium* spp. Количество от фецесите беше съхранено чрез замразяване за последващи молекулярно-генетични изследвания.

13. Молекулярно- епидемиологично проучване на епидемии, предавани чрез храни и води с хуманно и ветеринарно медицинско значение за целите на съвременен интегриран надзор
Ръководител гл.ас. Мария Павлова; НРЛ чревни бактерии и коки, НЦЗПБ *Участници:* Е. Александрова, доц. И. Иванов, проф. Христо Д-р Гергана Матева, Д-р Михаил Миланов, НДНИВМИ

Проектът предвижда цялостно геномно секвениране на бактериални изолати от храни, животни и хора с лабораторно доказани хранителни токсикоинфекции и хранителни интоксикации. Събират се нужните за целта на проекта изолати от епидемии, предавани по храни и води в страната. До момента са събрани 300 изолата *Salmonella enterica* и 200 изолата *Campilobacter sp.* Изчаква се стартиране на WGS.

14. Наблюдение на циркулацията и анализ на генотипната принадлежност на вирусите на морбили, паротит, рубеола и парвовирус В19 в страната *Ръководител:* доц. Стефка Иванова, НРЛ „Морбили, паротит, рубеола, НЦЗПБ *Участници:* екип от НРЛ „Морбили, паротит, рубеола” и НРЛ „Грип и ОРЗ .

Събиране и съхранение на клинични проби за целите на проекта: Общо 44 клинични проби (назофарингеални секрети) от 44 пациенти, лабораторно потвърдени за остра инфекция с морбилен вирус (MV) през периода 2013-2020 г. Материалите се съхраняват в биологичната банка на НРЛ „Морбили, паротит, рубеола”. Анамнестичните данни са снети от съпроводителни писма предоставени от лечебни заведения (Инфекциозни отделения на МБАЛ и УМБАЛ, както и от РЗИ) в страната и се съхраняват в база данни. Пациентите са с доказан В3 и D8 морбилен генотип.

Отработен е протокол за провеждане на Nucleotide-Specific Multiplex PCR анализ, за определяне на геномната принадлежност на циркулиращите в страната морбилни щамове.

Използвани са групи праймери, които са чувствителни към специфични нуклеотидни региони на активните MV клейдове и генерират фрагменти със фиксирани за типа размери. Последните бяха анализирани чрез конвенционална електрофореза в агарозен гел.

Резултати: Сред всички изследвани проби беше доказан клейд D при 4 (4/44, 9%) и клейд В при 38 (38/44, 86%) положителни за MV PCR проби. При две от тестваните проби, MV не беше успешно генотипиран. Доказано положителните проби от клейд D бяха от 2013, 2017 и 2019, а от В от морбилния взрив в България през 2019 и 2020 г.

15. Масспектрометрия и протеомен анализ за идентификация на дрожди, с акцент върху представители от род *Candida* и род *Cryptococcus* *Ръководител:* гл. ас. д-р Ива Филипова, дм, НРЛ „Микози и СПИ”

Набиране на подходящи клинично значими изолати – събрани и идентифицирани са общо 170 клинично значими изолата от род *Candida* и род *Cryptococcus*

16. Молекулярни методи за прецизна идентификация и анализ на циркулиращите в страната медицински значими гъбички *Ръководител:* гл. ас. д-р Ива Филипова, дм

Етап на изпълнение Набиране на подходящи клинично значими изолати – събрани и идентифицирани с конвенционални методи са общо 188 клинично значими изолата, изолираните ДНК се съхраняват на -79°C за последващ анализ

17. Въвеждане на MALDI-TOF-MS като иновативна технология за бърза индикация и типирание на високо рискови бактериални патогени с потенциал за биотерористично приложение/епидемично разпространение. Ръководител гл.ас. д-р Искра Томова дм,
Участници: екип на НРЛ ООИ, НЦЗПБ

Цел: Повишаване капацитета за еволюционно и епидемично типирание, както и за бърза идентификация на причинители на ООБИ чрез MALDI-TOF-MS.

Основни методи : култивиране, класическа реидентификация, инактивиране, генетично типирание, литературна справка и MALDI-TOF-MS тестване за специфичност и възпроизводимост, анализ на резултатите.

- Извършена е с MALDI-TOF ре идентификация на 36 броя щамове от лабораторната колекция на НРЛ ООБИ - 28 броя *F tularensis* и 8 броя *Brucella*. Щамовете са инактивирани и подготвени за генетично, в частност целогеномно секвениране. Очакват се резултати
- Изследваните щамове са запазени на среда за съхранение на -800C във фризер закупен по проект BG05M2OP001-1.002-0001-C04
- Уточнени са по произход (хора/животни), регион, година и др. щамове *B. anthracis*, които да бъдат оживени за по-нататъшните дейности предвидени в проекта.
- Извършено е проучване на литературните данни за избиране на подходяща схема, с цел изграждане на база данни от профили на български ООИ щамове
- Апаратът е приложен в практиката при международен външен контрол за наличие на *Legionella* spp. в 10 клинични проби и 20 от околна среда, при което успешно бяха идентифицирани четири вида легионелни бактерии, причинители на фатални инфекции при хора, за които няхахме други възможности към момента

18. Въвеждане на MALDI-TOF-MS за идентификация на стрептококи, стафилококи и коринебактерии

Ръководител: гл. ас. д-р Антоанета Дечева, дм

Участници: М. Павлова, Е. Александрова, Р. Христова, Д. Дончев, С. Лозенов, Л. Боянова, И. Иванов

Предварително планирано беше да се изследват 50 щама коки и коринебактерии с MALDI-TOF-MS за видова идентификация.

В 2021 г. Бяха изследвани 50 щама коки и коринеформени бактерии:

Streptococcus pyogenes, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, орални алфа-хемолитични стрептококи, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, включително някои еталонни АТСС стрептококови щамове;

Staphylococcus aureus, коагулаза-негативни стафилококи, включително някои еталонни АТСС стафилококви щамове;

Bordetella pertussis – еталонен АТСС щам, *Rothia dentocariosa*, *Haemophilus influenzae*;

Acinetobacter junii и *Microbacterium liquefaciens*. За 47 от 50-те щама предварителната фенотипна идентификация съвпадна с тази, получена от MALDI-TOF-MS видовата идентификация. Три от 50-те щама бяха фенотипно идентифицирани като *Streptococcus agalactiae*, но MALDI-TOF-MS идентификация показва *Enterococcus faecalis*. Приемаме за по-досторерен втория резултат, още

повече че се касае за три епидемично свързани изолата – от влагалище на родилка и кръв от двата ѝ близнака.

19. Идентификация на предавани с вектори (кърлежи, комари, флеботоми) патогени, причиняващи инфекции при хората - целогеномно секвениране на циркулиращите в страната арбовируси и проследяване на техния произход в зависимост от степента на генетично сходство Ръководител: проф. д-р Ива Христова Участници : Ива Трифонова, Елица Панайотова, Теодора Гладнишка, Евгения Тасева, Владислава Иванова, Емилия Иванова - НРЛ вектор-преносими инфекции

Установен е вирус на кърлежовия енцефалит при едни пациенти. Идентифицирани са хантавируси в 14 кръвни проби от 12 пациента. Направено е типизиране със серологични методи. При 9 от пациентите се доказва хантавирус Добрава и при 3 пациенти се установи хантавирус Пуумала. С PCR се идентифицира хантавирус Добрава при две от пробите и при една се установи хантавирус Пуумала. Предстои закупуване на специфични реактиви за целогеномно секвениране на хантавируси.

20. Установяване на разпространението на норовируси и хепатит А в живи двучерупчести мекотели, добити от производствени зони в Черно море. За детекция на вирусните геноми на Hepatit A и Норовируси (NoV) ще бъдат приложени едностъпков RT Real-time PCR
Ръководител: гл.ас. д-р Гергана Крумова-Вълчева НДНИВМИ
Участници: ас. д-р Екатерина Милева,. НДНИВМИ

21. Клинични, етиологични и епизоотологични проучвания върху заразната ектима по овцете и козите у нас през годината. Ръководител: проф. Р. Пешев д.н., НДНИВМИ

22. Етиологични и епизоотологични проучвания върху някои остро протичащи бактериални болести при преживни животни със зоонозен потенциал - антракс и листериоза“

Ръководител: гл. ас. д-р Йоско Петков, д.в.м.

Участници: доц. д-р А.Димитрова, доц. д-р Т.Савова-Лалковска, гл. ас. д-р Е. Гюрова, НДНИВМИ; ас. д-р Р. Петрова, д-р Р. Ненова, НЦЗПБ, доц. Иван Иванов, НЦЗПБ, гл. ас. д-р Е. Тасева, НЦЗПБ, проф. д-р Христо Найденски, ИМ-БАН, НДНИВМИ

23. Анализ на циркулацията и генотипната принадлежност на човешки и животински щамове *S. burnetii* от спорадични случаи, епидемични взривове и заразени животни в страната.

Ръководител: доц.Петя Генова-Калу, НРЛ „Рикетсии и клетъчни култури“, НЦЗПБ

Участници: Радослав Маринов, редовен докторант (НРЛ „Рикетсии и клетъчни култури“,НЦЗПБ; доц. д-р Константин Симеонов, двм (Р-тел НДЛ „Ензоотична левкоза по говедата“ и „Вирусни болести по животните, хламидии и рикетсии“, НДНИВМИ)

Анализирани са 529 човешки пациентски и 168 проби от животни. Всички проби бяха систематизирани, съгласно събрани анамнестични и епидемиологични данни и изследвани чрез имуноензимен (ELISA) и молекулярен (PCR) метод. Сред изследваните пациентски кръвни проби, положителен резултат за остра *S. burnetii* инфекция е доказан при 94 пациенти (94/529,

17,78%, 95% CI: 14,52 ÷ 21,04) чрез ELISA метод (наличие на anti-*S. burnetii* Ph. II IgM антитела) и при 83/529 (15,69%, 95% CI 21,31÷28,69) чрез PCR (*S. burnetii*-ДНК, СВ1/СВ2 регион). Най-засегнати са лицата > 30 г., т.е. заетите с активна трудова дейност. Данните относно половото разпределение в изследвана група е, както следва: 69,71% са мъже и 30,29% - жени. По отношение изследваните проби от животни, чрез PCR анализ в млечни проби, е доказана екскреция на патогена в 9 от изследвани общо 149 проби от сурово мляко. При 7 от изследваните 20 диагностични проби от абортирали животни от страната (плаценти, фетуси и вагинални натривки), е получен положителен резултат за наличие на геном на *Coxiella burnetii*. Екстрахираната ДНК, както и амплифицираните PCR продукти от хора и животни са съхранени за извършване на последващ геномен анализ чрез секвениране.

24. Диференциация и молекулярно генотипиране на причинителя на туберкулозата по говедата

Ръководител: д-р Таня Савова-Лалковска, д.в.м. НДНИВМИ

Участници: гл.ас.д-р Йоско Петков, дvm., доц. д-р Албена Димитрова, дvm, НДНИВМИ проф. д-р Магдалена Боновска, дvm, гл. Ас. Виолета Вълчева, дб. Институт по Микробиология, БАН

25. Проучване на видовото разнообразие на представителите от род *Vibrio* и *Aeromonas* с клинично значение в питейни, канални и морски води

Ръководител: доц. Петя Орозова, дб

Участници: гл. ас. д-р Гергана Крумова, ас. д-р Димитър Иванов, Весела Илчева лаборант – НДНИВМИ; гл. ас. д-р Румяна Ненова, гл. ас. д-р Искра Томова, НЦЗПБ

Дейност 3. Проучвания върху лекарствената резистентност на патогенни микроорганизми

Научно-изследователските дейности се извършват съгласно планираната тематика, както следва

1. Проучвания върху лекарствената резистентност при грипни вируси *Ръководител:* проф. д-р Нели Корсун, *Участници:* екип от НРЛ Грип и ОРЗ, НЦЗПБ

Съхранени са 149 РНК проби, положителни за грипен вирус А(Н1N1)pdm09, които ще бъдат изследвани чрез Real-Time RT-PCR за наличие на мутацията Н275Y, отговорна за резистентност към Oseltamivir (Tamiflu). Сред секвенираните в Световния колабориращ център по грипа в Лондон 21 А(Н1N1)pdm09 щама тази мутация не е установена

2. Молекулярно-генетично проучване върху механизмите на антимикробна резистентност и техните вектори при клинично значими чревни бактерии

Ръководител: гл.ас. Мария Радославова Павлова, дм, НРЛ Чревни инфекции, НЦЗПБ;

Участници: екипи от НРЛ Чревни инфекции, НРЛ КМАР- НЦЗПБ, и екип от НДНИВМИ

Цел: Проучване на генетичните детерминанти обуславящи резистентност към различни класове антибиотици и извършен целогеномен анализ на определена извадка от щамове с разнородни механизми на резистентност и видова принадлежност.

До момента са извършени ретроспективни и фенотипни проучвания на запазените човешки изолата *Salmonella enterica*, *Shigella sp*, *Campylobacter jejuni*, *Y. enterocolitica* и диарогенни *E. coli*

3. Молекулярно-епидемиологичен надзор на мултирезистентната туберкулоза в България чрез цялостно геномно секвениране и анализ на единични точкови мутации за доказване и проследяване на епидемично разпространяващи се щамове.

Ръководител: Проф. дн Стефан Панайотов
Участници : ООБИ, сектор „Микробиом” и НРЛ
„Туберкулоза
Етап на изпълнение: 70%

Извършени изследвания: Генотипиране, секвениране и анализ на мултирезистентни щамове на *M. tuberculosis*. Получени резултати: Направено е генотипиране, пълно геномно секвениране и биоинформатичен анализ на 65 мултирезистентни щамове на *M. tuberculosis*.

4. Въвеждане на направлявана от антибиотичната резистентност терапия на инфекции с *Mycoplasma genitalium*
Ръководител гл. ас. д-р Ива Филипова, дм
Участници екип от НРЛ СПИ - НЦЗБ

Етап на изпълнение От началото на 2021г. е въведена направлявана от антибиотичната резистентност терапия при седем пациента с инфекции с *Mycoplasma genitalium*

5. Въвеждане на целогеномно секвениране при надзора на антибиотичната резистентност при *Neisseria gonorrhoeae*

Ръководител гл. ас. д-р Ива Филипова, дм
Участници екип от НРЛ СПИ и НРЛ Молекулярна микробиология - НЦЗБ

Етап на изпълнение Получени резултати за три гонококови изолата от 2019.

6. Мултилокусно геномно типизиране (MLST) и антибиотична резистентност при *Treponema pallidum subsp. pallidum*

Ръководител гл. ас. д-р Ива Филипова, дм
Участници екип от НРЛ СПИ и НРЛ Молекулярна микробиология - НЦЗБ

Етап на изпълнение Набиране на подходящи за типизиране проби от пациенти със серологично доказан сифилис

7. Проучвания върху лекарствената резистентност при медицински значими гъбички

Ръководител: д-р Л. Боянова
Участници екип на НРЛ СПИ, НЦЗПБ

Цели – определяне на МИК на антимицотици чрез E-test; Генетично проучване на детерминанти на резистентност. Резултати до момента

- идентификация на 10 броя гъбични щамове, изолирани от клинични материали
- изследване на антимицотичната чувствителност на гъбичните щамове чрез E-test
- поръчани консумативи за генетичното проучване на детерминанти на резистентност

8. Проучване на таргетни мутации, асоциирани с резистентността на щамове от род *Mycobacterium*, разпространени в България
Ръководител: доц. д-р Елизабета Бачийска.
Участници: екип на НРЛ по туберкулоза, НЦЗРБ

С MALDI Biotyper видово са определени 41 NTM щамове и сравнени с получените резултати от LPA: *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. mageritense*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. xenopi*, *M. lentiflavum*. Подготвени са други щамове за видова идентификация.

9. Проучване на генни мутации отговорни за лекарствена резистентност при *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Pneumocystis jirovecii* и *Trichomonas vaginalis*

Ръководител проф. д-р И. Райнова *Участници* екип на отдел ПТМ

Набиране /съхранение на проби: 100 (бронхо-алвеоларен лаваж, индуцирана храчка, трахеален аспират и гърлен секрет - 70, хепаринизирана кръв за малария - 26, урина/еякулат - 4)

Извършени изследвания: 70 RT-PCR и 2 конвенционални PCR

Получени резултати: 11 изолата показващи наличие на ДНК на *P. jirovecii* са изследвани за точкови мутации в гена, кодиращ ензима dihydropteroate synthase (DHPS) на *Pneumocystis jirovecii*, отговорни за резистентност към Trimethoprim-Sulfamethoxazole, препарат от първа линия за лечение на пневмоцистна пневмония. DHPS генът беше успешно амплифициран във всички 11 (100%) проби, използвайки протокол за тъчдаун PCR. В RFLP-PCR анализа, за разграничаване на диви и мутантни DHPS генотипове, продуктите не показват наличие на мутации - всички изолати са генотипове от див тип.

10. Проблемни карбапенем - резистентни грам-отрицателни микроорганизми, изолирани от клинични материали в МИ-МВР: определяне типа на продуцираните карбапенемази, фенотипно и молекулярно-генетично характеризирани и преглед на терапевтичните възможности. *Ръководител: проф. д-р Емма Кьолян* *Участници: екипи от МИ-МВР и НРЛ КМАР, НЦЗПБ*

Дейност 4. Патология на имунния отговор срещу микроорганизми

1. Биомаркери на протективен и патологичен имуен отговор срещу патогени, разграничаващи фазите на инфекция и прогнозиращи ефекта от специфичната профилактика и терапия

Ръководител: проф. д-р Мария Николова

Участници: гл. ас. Яна Димитрова Тодорова, гл. ас. Радослава Емилова Грозданова, лаборанти, НРЛИ – НЦЗПБ

1.1. Имуен отговор срещу МТВ

Оптималната активация и качествата на последващия адаптивен отговор зависят от баланса между про/ анти-инфламаторните ейкозаноиди. Стимулираната с ФХА концентрации на LXA4, PGE2 и съотношението на абсолютните им стойности PGE2/LXA4 бяха изследвани при донори с активна инфекция (АТВ, n=15), латентна инфекция (ЛТВ, n=22) и при лица след неотдавнашен контакт с АТВ (RC n=12), както и преди и след стандартна противотуберкулозна терапия АТВ-Т (n=6). Установено е значително увеличено съотношение PGE2/LXA4 при АТВ и RC, като специфичната терапия води до нормализирането му. Съхранени са биологични материали както следва: изолирани мононуклеарни клетки (от 199 лица), плазма от неспецифично стимулирана периферна кръв и плазма от стимулирана с RD1 пептиди от периферна кръв (889 аликвоти). Същите ще се използват за последващи фенотипни и функционални изследвания. Предстои функционална оценка на ефекта на Т-регулаторните субпопулации върху МТВ-специфичния отговор (след деплетиране посредством флуоресцентно-активиран клетъчен сортер).

1.2. Имуnen отговор срещу SARS-CoV-2

Въведени са флоуцитометричен и ELISpot методи за оценка на SARS-CoV-2 специфичния Т-клетъчен отговор, както и модифициран протокол за детекция на паметови SARS-CoV-2 специфични Т-клетки.

Биобанкирани се периферни мононуклеарни клетки и плазма от: пациенти с остра инфекция и на различни етапи след прекаран COVID-19; HIV+ лица след COVID-19, HIV+ и HIV- лица, имунизирани срещу SARS-CoV-2

Изследван е вирус-специфичният Т-клетъчен отговор при лица, имунизирани с Comirnaty (n=49) и с Vaxzevria (n=18), 55 и 110 дни след прилагане на първата доза.

Изследвани са вирус-специфичният хуморален (Nab, IgA) и клетъчен имуnen отговор, както и промените в основните имунологични показатели (CD4AC, CD4/CD8, CD38ABC, цитокинов профил) на HIV+ART+ лица след завършена имунизация срещу SARS-CoV-2 и/или прекарана инфекция. HIV+ лица с контролирана HIV инфекция развиват адекватен клетъчен и хуморален имуnen отговор към SARS-CoV-2 ваксини, без непосредствени неблагоприятни ефекти върху имунното възстановяване. Нивата на RBD-свързващи IgA и RBD-блокиращи антитела след ваксиниране, са значимо по-високи, отколкото след преболедуване.

Установяват се значими разлики между цитокиновия фон след боледуване и след ваксиниране. Последният се отличава с по-високи нива на цитокини, индуциращи лимфопоезата и диференциацията на Th1 и В-клетъчен отговор (IL-15,-18, -21, GM-CSF) на фона на добре контролирана провъзпалителна реакция (IL-10, IL-1Ra vs. IL-6, IL-1 α , IL-1 β). Установява се диференциране на цитокиновия фон и в зависимост от типа приложена ваксина.

2. Приложение на показателите на жлезения метаболизъм за оценка на нискостепенната имунна активация при HIV+пациенти с трайна вирусна супресия

Ръководител: проф. д-р Мария Николова

Участници: гл. ас. Яна Тодорова, гл. ас. Радослава Грозданова, лаборанти, НРЛИ – НЦЗПБ, екип на СБАЛИПБ – София

3. Оценка на локалния протективен имуnen отговор при пациенти с рецидивирани инфекции (дихателни, урогенитални, гастро-интестинални), без системни прояви на имуnen дефицит

Ръководител: проф. д-р Мария Николова

Участници: доц. Г. Николов, гл. ас. Яна Тодорова, гл. ас. Радослава Грозданова, лаборанти, НРЛИ – НЦЗПБ, съвместно с НРЛ по Чревни инфекции, патогенни коки и дифтерия, НРЛ КМАР, НРЛ Диагностика на паразитозите

Апробиран е хемилуминисцентен метод за количествена оценка на: общи IgA и IgE имуноглобулини в слюнка, назален и слъзен секрет. С цел оптимизиране на пробовзимането са направени сравнителни измервания на проби от назален секрет (сух тампон и филтърна хартия) и слюнка (директно събрана проба и филтърна хартия).

Пилотно проучване на концентрацията общ IgE в слюнка за проследяване на ефекта от терапия с Омализумаб при пациенти с алергична астма. Предстои разработване на метод за отчитане на маркери на възпалението на ниво чревна лигавица.

4. Маркери на възпалението при вирусни хеморагични трески – клинично и прогностично значение

Ръководител: проф. Ива Христова - НРЛ вектор-преносими инфекции

Участници : Ива Трифонова, Елица Панайотова, Теодора Гладнишка, Евгения Тасева, Владислава Иванова, Е Иванова, М. Николова и екип на НРЛИ

5. Маркери на протективен имунен отговор при някои протозойни и хелминтни инвазии за определяне стадия на инфекцията и ефективността от лечението.

Ръководител: доц. д-р Райнова *Участници:* Елеонора Кънева, д-р Искрен Кафтанджиев – отдел Паразитология; М. Николова и екип на НРЛИ

Набиране /съхранение на проби: За 2021 г. са събрани и обработени общо 86 проби от пациенти, суспектни за различни паразитни заболявания:

39 проби за протозоози – токсоплазмоза - 34, малария – 2, криптоспоридиоза – 1, лайшманиоза – 2 и 47 за хелминтози – токсокароза – 27, 18 за ехинококоза, 1 за трихинелоза и 1 за цистицеркоза.

Извършени изследвания: През годината са извършени серологични изследвания на пробите за токсоплазмоза, токсокароза, ехинококоза, трихинелоза, цистицеркоза, лайшманиоза. За проучването на цитокиновия профил при пациенти с паразитози кръвните проби са активирани по определена методика и са замразени на -70°C. Изчаква се събирането на по-голям брой проби за проучване на цитокиновия профил при паразитозите.

Извършено е микроскопско паразитологично изследване на фекална проба от пациент с данни за криптоспоридиоза.

Получени резултати: От проведените серологични изследвания положителен резултат е получен при 21 от изследваните 34 серуми за специфични антитела при токсоплазмоза, при 4 от 27 те серума от пациенти със съмнения за токсокароза, при 1 от 18 изследвани за ехинококоза и при микроскопското изследване с оцветяване по Цил-Нилсен за криптоспоридиоза.

Предстои определяне на някои серумни цитокини и тяхното значение при лица с тези паразитози.

6. Анализ, доказване и синтез на нови консервативни епитопи от грипен вирус за имунопрофилактика и имунотерапия.

Ръководител: доц. д-р Андрей Чорбанов ИмБ, БАН *Участници* гл. ас. д-р Н. Михайлова, Гл. ас. д-р К. Николова-Ганева, ас. И. Манойлов; Докторанти С. Брадянова, Г. Бонева, Н. Ралчев, Е. Стоянова

Съгласно работната програма проекто-епитопите от грипния вирус ще бъдат тествани върху С57В6 мишки, които са носители на МНС клас I алелите H2-Db и H2-Kb и на МНС клас II алела I-Ab. За прогнозиране на пептидите, произлизащи от грипния хемаглутинин и свързващи се към мишите МНС протеини, е необходимо предварителното извеждане на имуноинформатични модели. За целта бяха приложени два подхода – секвенционален и структурен. За секвенционалния анализ бяха компилирани групи от пептиди с известен афинитет към трите тествани алела от базата данни Immuneepitope (www.iedb.org). Те са обект на имуноинформатичен анализ чрез статистически методи и методи за машинно обучение.

Получените модели ще бъдат валидирани чрез външни тестови групи и най-добре представилите се ще бъдат използвани за прогнозиране афинитета на пептиди от структурните протеини на грипния вирус. За структурния анализ бяха конструирани три комбинаторни пептидни библиотеки въз основа на кристалографските структури на комплексите пептид-миши МНС протеин. Всеки пептид се доква върху съответния МНС протеин и енергията на

образувания комплекс се оценява. Енергиите на образуванияте комплекси ще бъдат използвани при извеждането на структурен модел за прогнозиране на афинитета на пептидите към мишите МНС протеини.

Дейност 5. Създаване на биологична банка за патогенни микроорганизми и клинични материали

1. В хода на всяка от изброените научни разработки се събират и съхраняват
Изолирани и охарактеризирани микроорганизми (бактерии, вируси, гъбички, паразити).
Проби от човешки произход (РНК, ДНК, клетки от кръв и/или лимфна тъкан, бронхиален лаваж, ликвор и др.; серум, плазма, слюнка)
Проби от животински произход
2. Изготвени са стандартни оперативни процедури (СОП) за събиране, съхранение и ползване на проби от клиничен материал; изолиране, характеризирание и съхранение на микроорганизми (бактерии, вируси, гъбички, паразити). събиране, съхранение и ползване на проби от животински произход
Срок: постоянен
Отг. Ръководителите на научни разработки

Дейност 6. Разпространение на резултатите от научните изследвания

Поради епидемичната обстановка през 2021 г. не е проведен планираният „Ден на отворени врати“ за популяризиране на напредъка по проекта,

- Сътрудничество с аналогични центрове и инфраструктури в европейски и други страни
- a. Център за разработване на ваксини – Франция (Center of Excellence Vaccine research Institute – отг. проф. М. Николова
 - b. Център за компетентност в областта на инфекциозните болести – Хърватска – отг. проф. И. Христова

Дейност 7. Трансфер на знания и осигуряване на специализирани научно-изследователски услуги

7.4. Идентифициране на потенциални бизнес-партньори в страната и чужбина

Установена е връзка и са обсъдени възможности за сътрудничество (contract research) с:

J. Cardone, Strategy Manager - Oxford Immunotech, относно

Приложение ва T-SPOT.TB за разграничаване на активна от латентна ТВ инфекция

Оценка на нови диагностични платформи (на базата на детекция на ДНК или биомаркери) за диагностициране на активна ТВ инфекция

X. Гошев, изпълнителен директор Distribution Hub - Scientific BioTech Ltd. относно

Валидиране на метод за активиране продукцията на IL-1Ra в автоложен серум. Продуктът е с широка приложимост за терапия на хронични възпалителни заболявания

Научни публикации с цитиране на проекта

1. Пълната секвенция на българския производствения ваксинален щам БЦЖ SL222 София е депозирана в базата данни GenBank и е със свободен достъп - [CP064405](#)
2. **Panaïotov, S.** et al. Complete Genome Sequence, Genome Stability and Phylogeny of the Vaccine Strain *Mycobacterium bovis* BCG SL222 Sofia. *Vaccines* **2021**, 9(3), 237. ИФ 4.086
3. **Panaïotov, S.** et al. Complete Genome Sequence of *Mycobacterium bovis* BCG SL222 Sofia, the First WHO Reference Reagent for the *M. bovis* BCG Vaccine of the Russian BCG-I Substrain. *Microbiology Resource Announcements*, **2021**, 10 (3) e01318-20; ИФ 0.785
4. **Panaïotov S**, Hodzhev Y, Tolchkov V, et al. Draft Genome Sequences of 77 Endemic Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains of SIT41 (TUR) Spoligotype from Bulgaria), **2022**, *Microbiology Resource Announcements*. (accepted for publication). ИФ 0.785
5. **Толчков В., и сътр.** Составление електронных тестов чувствительности *mycobacterium tuberculosis* к лекарствам методом целлогеномного секвенирования следующего поколения с помощью программного обеспечения «mykrobe» в сопоставлении с фенотипическими тестами и методом ПЦР. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии* -
6. **Ch. Ismailova**, V. Yontcheva, T. Tenev, E. Golkocheva-Markova Correlation between the antibody response toward specific HCV proteins and HCV viral load. *Probl. Infect. Parasit. Dis.*, **2021** 49 (1):13
7. **S. Yordanova**, et al. Isoniazid-mono-resistant tuberculosis in Bulgaria. *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, Vol. 48, **2020**, 1, p. 21-24.
8. **S. Krumova**, I. Andonova, S. Stoitsova, et al. Prevalence of measles IgG antibodies among healthcare workers in Bulgaria. *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, **2021**, Vol. 49, 2.
9. **И. Андонова**, Р. Стефанова, М. Пишмишева-Пелева и сътр. Вирусни инфекции през 2020 година с обривен и фебрилно-интоксикационен синдром при деца по време на Covid-19 пандемията в България. *Педиатрия*, **2021**, 3, 2-5.
10. **I. Andonova**, R. Stefanova, S. Krumova: Laboratory comparative analysis of serological and molecular biological methods for detection of measles virus in Bulgaria, *Probl Infect Parasit Dis*, **2020**, vol.48 (2), p 5-11.
11. **М. Pavlova** , E. Alexandrova , G. Kamenov , V. Velev , T. Kantardjiev. Dynamics of the etiological structure and sensitivity to antibacterial agents of salmonellosis in Bulgaria for the period 2016 – 2019. *Probl. Inf. Parasit. Dis.* Vol. 48, **2020**, 3.
12. **М. Павлова**, М. Попов, Е. Александрова, В. Велев. Шигелоза при деца – клинично протичане и антимикробна чувствителност. *Обща медицина*. **2020**; 22(6): 33-36.
13. **М. Pavlova**, E. Alexandrova, G. Kamenov, V. Velev, T. Kantardjiev. Dynamics of the etiological structure and sensitivity to antibacterial agents of Salmonellosis in Bulgaria for the period 2016 – 2019. *Probl inf par dis.*, **2021**; Vol. 48(3), 31-35.
14. **М. Pavlova** et al. *Campylobacter* infections among Bulgarian children: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. *Biotechnol. & biotechnol. eq.*, **2020**; 34, 1: 1038-1042. ИФ 1.6
15. **М. Pavlova**, E. Alexandrova, Y. Kalchev, V. Velev, M. Murdjeva, T. Kantardjiev. A study of paratyphoid fever in Bulgarian children. *Acta Medica Bulgarica*, **2020**, 3
16. **Philipova I** et al. T. "Antimicrobial resistance and whole genome sequencing analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bulgaria, 2019." *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci* (ahead of print) ИФ 0.38
17. **E. Bachiyska**, et al. First etiologically confirmed cases of *Mycobacterium marinum* infection in Bulgaria, 2020, *Folia Medica* 62(2): 398-402 DOI: 10.3897/folmed.62.e47220. ИФ 0.84
18. **S. Yordanova**, E. Bachiyska, Y. Atanasova, A. Baykova, „Whole genome sequencing of Bulgarian rifampicin resistant *M. tuberculosis* strains”, **2022**, *Folia Medica*, приета за публикуване ИФ 0.84
19. **E. Bachiyska**, Y. Atanasova, A. Baykova, S. Yordanova „*M. intracellulare* among TB suspected patients in Bulgaria – microbiological aspects“, **2022** *Folia Medica*, приета за публикуване ИФ 0.84
20. **Alexiev I**, Campbell EM, Knyazev S, et al. Molecular Epidemiological Analysis of the Origin and Transmission Dynamics of the HIV-1 CRF01_AE Sub-Epidemic in Bulgaria. *Viruses*. **2021**; 13(1):116. ИФ 5.01

21. **Alexiev, I.**, R. Dimitrova, A. Gancheva, et al.. Molecular epidemiological analysis of the transmission clusters of the HIV-1 circulating recombinant forms CRF01_AE and CRF02_AG in Bulgaria. *Problems of infectious and parasitic diseases*, volume 48, number 1/2020
22. **Christova I.**, Trifonova I, Gladnishka T, Dragusheva E, Popov G, Ivanova V. Viral load and antibody levels in patients with COVID-19. *GSC Adv Res Rev* **2021**, 08(3), 10-18.
23. **Alexiev I.**, Ivanov I, Philipova I, et al. Postvaccination SARS-CoV-2 Alpha (B.1.1.7) lineage infection among healthcare workers on the background of IgG antibodies. *J Med Virol.* **2021** Oct 14:10.1002/jmv.27394. doi: 10.1002/jmv.27394. ИФ 2.33
24. **M. Nikolova,** Y. Todorova, R. Emilova et al. Induction of humoral and cellular immune responses to COVID-19 mRNA and vector vaccines: A prospective cohort study in Bulgarian healthcare workers *J Med Virol.* **2022**;1–11. ИФ 2.33
25. **N. Korsun,** I. Trifonova, V. Dobrinov et al. SARS-COV-2: insight into the emerging genetic variants. *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, Vol. 48, **2021**, 3.
26. **A. Stoyanova.** Noroviruses - a hidden threat. *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, Vol. 48, **2021**, 3.
27. **E. Golkocheva-Markova,** Ch. Ismailova, T. Tenev, L. Nikolaeva-Glomb. Studies on the epidemiological and molecular characteristics of the hepatitis E virus in Bulgaria: a comprehensive review. *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, Vol. 48, **2021**, 3.
28. **L. Boyanova.** Molecular and Microbiological Approaches for Rapid Etiological Diagnosis of Systemic Mycoses *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, Vol. 48, **2021**, 3.
29. **L. Grigorova,** R. Dimitrova, A. Partsuneva, et al. Drug resistance mutations and transmission clusters of the HIV-1 crf01_ae sub-epidemic in Bulgaria. *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, Vol. 48, **2021**, 3.

Представени постери/доклади с цитиране на проекта

1. **Толчков В.,** Ходжев Й., Панайотов С. Определяне на антибиотичната резистентност на шамове *Mycobacterium*. XVIII Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, София, 30.09–02.10.2020 г., стр. 62
2. **Н. Корсун,** и сътр.. Национален Референтен Център „Респираторни инфекции и туберкулоза” – анализ на дейността през 2019-2020. Сборник научни трудове XVIII Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, София, 30.09–02.10.2020 г., стр. 11-12
3. **S. Panaiotov,** et al. Evolution and transmission analysis of a MDR *M. tuberculosis* endemic genotype in Bulgaria by whole genome sequencing. 6th Joint Conference of DGHM & VAAM, Leipzig, 8-11 March 2020, 657-МЕЕР, p 165.
4. **С. Панайотов,** и сътр. Екологичното адаптиране на генотиповете на *mycobacterium tuberculosis* като фактор за разпространение на туберкулозата. XVII Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, Парк хотел Москва 09-11 май 2019 г.
5. **Panaiotov, S.** Atanasova, Y. Baykova, A. Bachiyska E. Monitoring a multidrug-resistant *M. tuberculosis* endemic genotype in Bulgaria. 40th Congress of ESM. P038. 30.06-3.07.2019, Valencia,
6. **Panaiotov, S.** et al. Resuscitation of BCG in blood samples of BCG vaccinated individuals. 40th Congress of ESM. P024. 30.06-3.07.2019, Valencia, Spain
7. **Ю. Атанасова,** А. Байкова С. Йорданова, Е. Бачийска, Географско разпространение в България на някои видове нетуберкулозни микобактерии, 18и Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, София, 30.09.-02.10.2020. Сборник научни трудове, П 40, стр. 106-107.
8. **Andonova I.,** Stefanova R., Krumova S. „Measles Virus Genotyping by Nucleotide-Specific Multiplex PCR”. XXXI JUBILEE SCIENTIFIC CONFERENCE, UNION OF SCIENTIST – STARA ZAGORA, 03 - 04.06.2021.
9. **Е. Бачийска,** Ю. Атанасова, С. Йорданова, А. Байкова, А. Кърчева, В. Венциславова, В. Калудова, Г. Михайлова, Т. Андреев, Д. Иванова, М. Цолова. Микробиологично проучване на ко-инфекциите

- HIV/TB/NTM В България в пандемична COVID-19 обстановка; 5-та Национална Научна Конференция по HIV и коинфекции, София Хотел Балкан, 26-27 ноември **2021** г.
10. **Ходжев Й.**, et al. Физическа карта, молекулярна еволюция и геномна стабилност на щамата *Mycobacterium Bovis BCG-Sofia SL 222 (BCG-Sofia)*. XVIII Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската Асоциация на Микробиолозите, София, 30.09–02.10.**2020** г. стр. 37-38
 11. **В. Толчков**. Асемблиране на геноми с използване на технологията за фрагментно секвениране Illumina. Анонсиране на прокариотни геноми. Научен колоквиум „Приложение на методите на пълен геномен секвентен анализ и ДНК-баркодинг при диагностиката и контрола на патогенни микроорганизми във ветеринарната медицина и общественото здраве – Готова ли е България за предизвикателствата на бъдещето?“ 20.11.**2019**, хотел Форум, София
 12. **Е. Бачийска**, А. Байкова, Ю. Атанасова, С. Йорданова. Целогеномно секвениране на *M. tuberculosis* – възможности и реалности. 18и Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, София, 30.09.-02.10.**2020**. ОП, стр. 36-37.
 13. **Е. Бачийска** и сътр.. Целогеномно секвениране на български рифампицин резистентни щамове *M.tuberculosis complex*. 18и Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, София, 30.09.-02.10.**2020**. П 38, стр. 104-105.
 14. **Е. Бачийска**, и сътр. Пиросеквениране на резистентни щамове *M.tuberculosis* в България, 18и Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, София, 30.09.-02.10.2020. П 39, стр. 105-106.
 15. **С. Йорданова**, А. Байкова, Ю. Атанасова, Е. Бачийска, Мултирезистентна туберкулоза в детска възраст, 10и Национален симпозиум на Българската асоциация по детска пневмология, 24. – 25.10.**2020**, София, Сборник научни трудове, ОП стр.30.
 16. **Е. Бачийска**, А. Байкова, Ю. Атанасова, С. Йорданова, Съвременна микробиологична диагностика на туберкулозата в България, 10и Национален симпозиум на Българската асоциация по детска пневмология, 24.10-25.10.**2020**, София Сборник научни трудове, ОП стр.18.
 17. **I Philipova**, et al A whole-genome sequencing analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bulgaria: a pilot study“34th IUSTI-Europe Congress on Sexually Transmitted Infections and HIV/AIDS Bucuresti (live streaming), Romania, 03/09/2020-05/09/**2020**.
 18. **Р. Емилова**, Я. Тодорова, Г. Попов и сътр. Т – клетъчни имунофенотипни профили асоциирани с клиничната тежест на COVID-19. Научна сесия на Българската асоциация по клинична имунология, хотел Хилтън, м.12.**2020**
 19. **Р. Емилова**, Я.Тодорова, Н.Янчева. Вътреклетъчното желязо като маркер за имунното възстановяване при HIV позитивни лица с недоловим вирусен товар. XVIII Конгрес на БАМ, м. септември, **2020**
 20. **М. Nikolova**, R. Emilova, Y. Todorova, et al. No Impact of SARS-CoV-2 on the Activation Status of ART+HIV+ Patients ISHEID, 17-20.05.**2021**, Marseille, France
 21. **Я.Тодорова**, Р. Емилова, Ива Христова SARS-COV-2-специфичен т-клетъчен имунен отговор при ваксинирани лица, XIX Конгрес на БАМ, **2021**
 22. **Е. Бачийска**, Ю. Атанасова, С. Йорданова, А. Байкова РАЗПРОСТРАНЕН ЛИ Е MYCOBACTERIUM CHIMAERA СРЕД ПАЦИЕНТИ С БЕЛОДРОБНА ПАТОЛОГИЯ В БЪЛГАРИЯ 19 Национален Конгрес по Клинична микробиология и инфекции, София, Парк Хотел Москва, 14.09.-16.09.**2021** г.
 23. **Raynova, I. G, I. T. Kaftandziev, R. N. Harizanov, et al.**. Seroprevalence of human toxoplasmosis in Bulgaria and clinical presentation of the disease. 13th European Multicollloquium of Parasitology, 12-16 October **2021**, Belgrade, Serbia. Programme & Abstract Book, 252.
 24. **Tsvetkova, N.**, А. Ivanova, R. Harizanov, et al. A pilot study of drug resistance in *Pneumocystis jirovecii* isolates from Bulgarian patients with *Pneumocystis pneumonia*. ICFR 2021: International Conference on Fungal Research, 28-29 June **2021**, Istanbul, Turkey.
 25. **Райнова, И.**, Р. Харизанов, Н. Цветкова, И. Кафтанджиев, Р. Борисова. Смъртност и леталитет от ехинококоза за периода 2011 - 2020 г. VIII Национална конференция „Ефектът на пандемията

- КОВИД-19 върху ХИВ/СПИН и други инфекциозни заболявания“, 16-19 септември **2021** г., Цигов чарк, Резюмета, 37.
26. **Харизанов, Р.**, И. Райнова, И. Кафтанджиев, Н. Цветкова, Р. Борисова, А. Иванова, М. Виденова. Динамика на кистната ехинококоза в България (2006-2019) и сравнителен анализ със заболяемостта в страните членки на ЕС. VIII Национална конференция „Ефектът на пандемията КОВИД-19 върху ХИВ/СПИН и други инфекциозни заболявания“, 16-19 септември **2021** г., Цигов чарк, Резюмета, 39.
 27. **И. Алексиев**, И. Иванов, И. Филипова, и сътр. Анализ на въведените иразпространени SARS-COV-2 варианти в България чрез използване на целогеномно секвениране от ново поколение 19-ти Национален Конгрес по Клинична микробиология и инфекции, София, Парк Хотел Москва, 14.09.-16.09.**2021** г.
 28. **Р. Емилова**, Я.Тодорова, Н. Янчева имунологични ефекти на SARS-COV-2 ПРИ HIV+лица на продължителна антиретровирусна терапия (сART) 19 Национален Конгрес по Клинична микробиология и инфекции, София, Парк Хотел Москва, септември **2021**.
 29. **Н.Цветкова**, А. Иванова, И. Райнова и сътр. Първоначални данни за разпространението на пневмоцистозата средбългарското население. 19 Национален Конгрес по Клинична микробиология и инфекции, София, Парк Хотел Москва, 14.09.-16.09.**2021** г.
 30. **Р. Борисова**, Н. Цветкова, А. Иванова. сравнително проучване на ефективността на оцветителните микроскопски методи за диагностика на пневмоцистозата. 19 Национален Конгрес по Клинична микробиология и инфекции, София, Парк Хотел Москва, 14.09.-16.09.**2021** г.
 31. **А. Иванова**, Н. Цветкова, Р. Харизанов и сътр. Сравнение на диагностичната стойност на два таргетни гена за откриване на *Pneumocystis jirovecii* в клинични проби чрез real-time PCR 19 Национален Конгрес по Клинична микробиология и инфекции, София, Парк Хотел Москва, 14.09.-16.09.**2021** г.
 32. **Р. Димитрова**, А.Костадинова А. Парцунева, и сътр. Ранно и късно диагностициране на инфектираните с HIV В България (Предварителен анализ) 19ти Национален Конгрес по Клинична микробиология и инфекции, София, Парк Хотел Москва, 14.09.-16.09.**2021**.
 33. **А. Ганчева**, А. Костадинова, Р. Димитрова и сътр. ВЕРТИКАЛНА ТРАНСМИСИЯ НА HIV-1 ОТ МАЙКА НА НОВОРОДЕНО В БЪЛГАРИЯ (ПРЕДВАРИТЕЛЕН АНАЛИЗ) 19 Национален Конгрес по Клинична микробиология и инфекции, София, Парк Хотел Москва, 14.09.-16.09.**2021** г.

Приложение 2

Проект: BG05M2OP001-1.002-0001-C04

Брой изследователи, работещи в подобрени инфраструктурни обекти за научни изследвания, измерено в еквивалент на пълно работно време

Дата: 31.12.2021 г.

Изследователи с регламентирано работно време за работа с подобрената инфраструктура съгласно ТД, заповед и т.н.						
Бенефициент	Име и фамилия, длъжност	Работно време (часове на ден)	Начало на изпълнението на ТД	Край на изпълнението на ТД	Продължителност на ТД (в месеци, за календарната година)	Брой изследователи (измерено в ЕПРВ)
НЦЗПБ	проф. д-р Мария Стоименова, изследовател R4	1.5	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6.0	0.09
НЦЗПБ	проф. д-р Искра Райнова, изследовател R4	1.5	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6.0	0.09
НЦЗПБ	доц. Иван Иванов, изследовател R3	2.0	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6.0	0.13
НЦЗПБ	доц. Ивайло Алексиев, изследовател R3	2.0	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6.0	0.13
Изследователи с отчетено време за работа с подобрената инфраструктура съгласно Седмичните дневници						
Бенефициент	Име и фамилия, длъжност	Общо отчетено време	Начало на периода	Край на периода	Продължителност в месеци	Брой изследователи (измерено в ЕПРВ)
НЦЗПБ	гл.ас. Яна Тодорова	180.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.10
НЦЗПБ	гл.ас. Радослава Емилова	180.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.10
НЦЗПБ	Милена Алексова, докторант	90.00	1.10.2021	31.12.2021 г.	3	0.05
НЦЗПБ	Ренета Димитрова	180.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.10
НЦЗПБ	Ана Христова	180.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.10

НЦЗПБ	Ася Костадинова	180.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.10
НЦЗПБ	Александра Парцунева	180.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.10
НЦЗПБ	Любомира Григорова, докторант	180.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.10
НЦЗПБ	Иван Стойков, докторант	240.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.14
НЦЗПБ	Нина Цветкова	120.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.07
НЦЗПБ	Михаела Виденова	180.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.10
НЦЗПБ	Александра Иванова	180.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.10
НЦЗПБ	Елица Голкочева	120.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.07
НЦЗПБ	Чейдем Исмаилова	120.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.07
НЦЗПБ	Вилияна Йончева	120.00	01.07.2021 г.	31.12.2021 г.	6	0.07
Брой изследователи, работещи в подобрани инфраструктурни обекти за научни изследвания, измерено в ЕПРВ						1.22
Верифицирана стойност при предишния ПОД, подаден през текущата календарна година						0.00
Стойност на индикатора за текущия ПОД						1.22

Работно време - записва се средното работно време на ден съгласно трудовия договор (със закръгляне до първия знак след десетичната запетая)

Продължителност на ТД - изчислява се в месеци за цялата текуща календарна година (със закръгляне до първия знак след десетичната запетая)

Брой изследователи (измерено в ЕПРВ) - изчислената стойност показва актуалната стойност на индикатора към датата на отчета